

# 甘露醇再生培养基的改进

门 大 鹏

(中国科学院微生物研究所,北京)

陈 永 南

(北京大学生物系,北京)

John Spizizen

(Department of Microbiology and Immunology,  
University of Arizona, Tucson, Arizona 85724, USA)

芽孢杆菌原生质球再生细胞壁的实验多用 DM3 再生培养基<sup>[1]</sup>。甘露醇再生培养基也用于芽孢杆菌原生质球的再生<sup>[2]</sup>,但其再生率低于 DM3。甘露醇再生培养基与 DM3 相比,后者要添加牛血清白蛋白(BSA),其价格昂贵。DM3 中的琥珀酸钠不易制备高纯度产品,而甘露醇易于得到高纯度产品。本文报道改进的甘露醇再生培养基,提高了枯草芽孢杆菌原生质球的再生率。

## 材料与方 法

### (一) 菌株

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BR151 (trpC2, metB10, lys3, spo<sup>+</sup>, Neo<sup>S</sup>) 和 SR22 (trpC2, spoA12, Neo<sup>S</sup>)。

### (二) 培养基和溶液

DM3 再生培养基、4×PAB、2×SMM 和 SMMP/BSA 等均按 Chang, S. 及 S. N. Cohen<sup>[1]</sup> 的报道配制。甘露醇再生培养基的第一部分:酪蛋白氨基酸 (casamino acid) 5g, 酵母粉 5g, 琼脂 12g, 无离子水 350ml。第二部分:明胶 20g, 溶于 1M 甘露醇 500ml 溶液。第一部分与第二部分分别灭菌,冷却至 55℃ 左右将两部分混合在一起,在无菌条件下加入灭菌的 50% 葡萄糖 10ml, 5% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100ml, 1M MgCl<sub>2</sub> 20ml, 再加菌株所需氨基酸各 50μg/ml, 混匀倒平皿。TBAB 固体培养基<sup>[1]</sup>作活化菌株和菌落计数用。416# 液体培养基(蛋白胨 2%, 酵母粉 1%, NaCl 1%)作培养细菌用。

### (三) 试剂

甘露醇为 Sigma 产品,批号 21F-0561。

### (四) 原生质球的制备

先将枯草芽孢杆菌 BR151 或 SR22 划线接种于 TBAB 平皿, 37℃ 培养一天,接着再接种活化两次。接种少许活化的菌体于 10ml (装于 50ml 三角瓶内) 416# 培养液中, 30℃ 静止培养过夜。次日接种菌液于 50ml (装于 500ml 三角瓶内) 416# 培养液中, 其浊度为 Klet 读数 1—2 (红色滤光片), 37℃ 振荡培养至 Klet 读数 70 左右, 即为生长对数期。取 0.02ml 菌液经适当稀释, 涂于 TBAB 平皿, 进行活菌计数。菌液经 3000rpm 离心 15 分钟, 倒去上清液。菌体悬浮于 4ml SMMP 溶液中。加入新配制的 50mg/ml (溶于 SMMP) 溶菌酶 1ml, 置 37℃ 水浴摇床上缓慢摇动。溶菌酶处理 20 分钟后取样, 用相差显微镜检查原生质球形成的情况。一般有 95% 以上的细胞形成原生质球即可。这时 BR151 的细胞已绝大部分形成了原生质球, 细胞或芽孢极少。为了提高原生质球的形成率, 溶菌酶再继续处理 20 分钟。3000rpm 离心 10 分钟, 用灭菌滴管吸去上清液。加入 5ml SMMP/BSA 溶液, 洗原生质球一次。3000rpm 离心 10 分钟, 再次吸去上清液。加入 4ml SMMP/BSA 溶液悬浮原生质球, 供再生用。

取制备好的原生质球稀释至 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup> 和 10<sup>-3</sup>, 取 0.1ml 稀释液涂于 TBAB 平皿, 检查残存的细胞数(芽胞数)。平皿置 37℃ 培养 24 小时, 统计菌落数。

本文于 1985 年 7 月 5 日收到。

本实验是在美国亚利桑那大学微生物学和免疫学系 J. Spizizen 实验室完成的。

$$\frac{\text{每毫升残存细胞数/浓缩倍数}^*}{\text{每毫升活菌计数}} \times 100\% = \text{残存细胞率(1)}$$

残存细胞率的计算如(1)式。

原生质球经稀释涂于再生培养基上, 37℃ 培养 48 小时, 统计再生菌落数。原生质球的形成率和再生率的计算如(2)和(3)式。

$$\frac{\{(\text{每毫升再生菌落数/浓缩倍数}) - (\text{每毫升残存细胞数/浓缩倍数})\}}{\text{每毫升活菌计数}} \times 100\% = \text{原生质球形成率(2)}$$

$$\frac{\{(\text{每毫升再生菌落数/浓缩倍数}) - (\text{每毫升残存细胞数/浓缩倍数})\}}{\{(\text{每毫升活菌数}) - (\text{每毫升残存细胞数/浓缩倍数})\}} \times 100\% = \text{原生质球再生率(3)}$$

## 结果与讨论

### (一) 甘露醇、山梨醇浓度对再生率的影响

为探索增加甘露醇的浓度来提高培养基的渗透压, 或以山梨醇代替甘露醇, 提高原生质球在甘露醇再生培养基的再生率, 配制了不同浓度的甘露醇和山梨醇再生培养基, 琼脂由 12g 减为 8g。DM3 再生培养基作为对照, 实验结果列于表 1。山梨醇再生培养基的再生率低, 不宜采用。0.7M 的甘露醇再生培养基的再生率虽然低于 DM3, 但比 0.5M 的甘露醇再生培养基却有了提高, 值得进一步研究。

表 1 甘露醇、山梨醇浓度对再生率的影响

培养基	实 验 一			实 验 二		
	活菌计数 (个/ml)	再生菌落数 (个/ml)	再生率 (%)	活菌计数 (个/ml)	再生菌落数 (个/ml)	再生率 (%)
0.5M 甘露醇	$1.2 \times 10^8$	$3 \times 10^3$	0.0025	$1.5 \times 10^8$	$1.9 \times 10^4$	0.0126
0.6M 甘露醇	$1.2 \times 10^8$	$4 \times 10^3$	0.0033	—	—	—
0.7M 甘露醇	$1.2 \times 10^8$	$2.8 \times 10^4$	2.5	$1.5 \times 10^8$	$5.2 \times 10^3$	0.35
0.5M 山梨醇	$1.2 \times 10^8$	$3.2 \times 10^3$	0.0027	—	—	—
1.0M 山梨醇	—	—	—	$1.5 \times 10^8$	$1.1 \times 10^4$	0.0073
DM3	$1.2 \times 10^8$	$4.4 \times 10^4$	3.7	$1.5 \times 10^8$	$2.6 \times 10^4$	1.73

### (二) 明胶浓度的影响

降低琼脂用量后培养基较软, 培养基中的水份易于渗出。改变明胶的用量也将有相似的作用。其他成份不变, 配制 2%、1.5%、1% 和不加明胶的再生培养基。涂布原生质球后, 37℃ 培养 24 小时。加 1.5% 明胶的再生培养基上再生菌落生长快, 菌落大于其他处理的菌落。其再生率与 2% 明胶相比, 无明显差异。不加明胶的再生培养基上的再生菌落数未减少, 但菌落较小。实验表明适当地减少明胶用量, 对再生菌落的形成有利。不加明胶可能不利于维持培养基的含水量, 影响菌落的生长。

### (三) 葡萄糖浓度的影响

甘露醇在再生培养基中的主要作用是维持高渗透压。葡萄糖易于为细胞所利用, 是能量的主要来源。出乎意外地发现, 提高葡萄糖的用量能提高再生率。在 0.7M 甘露醇再生培养基中葡萄糖的量提高到 1%, 37℃ 培养 24 小时就生长出菌

落。由于稀释度偏低, 再生菌落数过多而无法计数。以后的实验将原生质球悬液稀释至  $10^{-7}$ , 再生菌落数仍然很高, 每个平皿上多达 2000 个左右。从表 2 可以看出, 加 1% 葡萄糖的甘露醇培养基, 原生质球的再生率可达 25%。DM3 再生培养基的再生率一般为 10—25%<sup>[1]</sup>, 表 2 中 DM3 再生培养基的再生率是偏低的。其原因是平皿在冷库里存放了十多天, 有部分水份渗出, 影响了再生细胞的生长。实验表明提高甘露醇再生培养基中葡萄糖的量, 其再生率可与 DM3 的再生率相似。

### (四) 不同菌株的效应

不同芽孢杆菌的种或菌株在形成原生质球和再生率方面有差异。枯草芽孢杆菌形成芽孢的

\* 由 50ml 菌液浓缩为 4ml, 浓缩倍数为 12.5。考虑到在原生质球的制备过程中细胞损失, 浓缩倍数以 10 计算。

表 2 1% 葡萄糖对再生率的影响

培养基	活菌计数(个/ml)	再生菌落数(个/ml)	残存菌落数(个/ml)	再生率(%)
0.7M 甘露醇 1%葡萄糖	$7.8 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$	$5.4 \times 10^8$	25.6
DM3	$7.8 \times 10^8$	$9.0 \times 10^8$	$5.4 \times 10^8$	0.12

表 3 BR151 和 SR22 再生率的比较

	菌株	活菌计数 (个/ml)	再生菌落数 (个/ml)	残存菌落数 (个/ml)	再生率 (%)
实验一	SR22	$2 \times 10^8$	$7.8 \times 10^8$	0	3.9
	BR151	$1.2 \times 10^8$	$3.5 \times 10^8$	$4.4 \times 10^8$	2.9
实验二	SR22	$2 \times 10^8$	$4.9 \times 10^8$	4×10	2.5
	BR151	$1.2 \times 10^8$	$3.1 \times 10^8$	$7.5 \times 10^8$	0.21

BR151 和不形成芽孢的 SR22, 在形成原生质球和再生率方面是否也有差异? 用 0.7M 甘露醇和 0.5% 葡萄糖的再生培养进行了比较。表 3 的结果说明 SR22 对溶菌酶比较敏感, 其残存细胞数大大低于 BR151, 而再生率也高于 BR151。若选用 SR22 作为原生质球转化的受体菌, 有可能提高转化率。

综合以上试验, 甘露醇的量由 0.5M 提高到 0.7M, 葡萄糖的量由 0.5% 提高到 1%, 琼脂由 12% 降为 0.8%, 明胶由 2% 降为 1.5%。改进后的甘露醇再生培养基的组成: 第一部分为酪蛋白氨基酸 5g, 酵母粉 5g, 琼脂 8g, 无离子水 350ml; 第二部分为明胶 15g, 溶于 1.4M 500ml 甘露醇溶液 (pH8, 1—8, 2)。分别灭菌后混合, 再加入 1MMgCl<sub>2</sub> 20ml, 5% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100ml, 50% 葡萄糖 20ml, 以及必需氨基酸各 50μg/ml。改进后的培

培养基提高了渗透压, 增加了能源, 降低了琼脂和明胶的用量。培养基较软, 又能维持一定的含水量, 这些都有利于原生质球的再生。

我们在实验中发现, 原生质球悬浮液不是匀质的, 原生质球易于聚集成团。因之用同一支吸管加相同量的悬浮液, 再生菌落数有时差异较大, 出现偏高或偏低现象。

### 参 考 文 献

- [1] Chang, S. and S. N. Cohen: *Mol. Gen. Genet.*, **168**:111—115, 1979.
- [2] Gray, C. and S. Chang: *J. Bacteriol.*, **145**: 422—428, 1981.
- [3] Difco Manual, Edited by Difco Lab. Ninth Edition, p. 115, 1955